

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 32620141150552

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**LMP-027 抗艰难梭菌活性、联合用药和耐
受突变株筛选鉴定研究**

**LMP-027 Anti-*Clostridium difficile* activity, drug
combination synergetic/additive effect, and tolerant mutant
screening and characterization**

刘俊坚

指导教师姓名: 赵西林 教授

专 业 名 称: 流行病学与卫生统计学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 5 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 5 月

LMP-027 抗艰难梭菌活性、联合用药和耐受突变株筛选鉴定研究

刘俊坚

指导教师

赵西林
教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(病原微生物与抗感染治疗)课题(组)的研究成果,获得(病原微生物与抗感染治疗)课题(组)经费或实验室的资助,在(病原微生物与抗感染治疗)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

刘俊星

2017 年 5 月 23 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ √ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

刘俊星

2017 年 5 月 23 日

摘要

抗菌药物是对抗细菌感染的有力武器，自第一种抗生素青霉素被发现并应用于临床以来，人类已经开发出多种抗菌药物，然而由于抗菌药物的不合理使用，细菌耐药问题日益严峻，多重耐药菌不断出现，对人类健康构成严重威胁。这需要研发新型抗菌药物用于治疗多耐药细菌引起的感染；然而传统抗菌药物开发耗时长、成本高、风险大，医药公司对此并不热衷，新型抗菌药物上市越来越少。老药新用是抗菌药物开发的新思路，这些药物已经用于临床或正在进行临床试验，安全性评价资料齐全，这大大减少药物开发的成本和风险。过去几十年间，艰难梭菌感染发病率和死亡率不断上升，已经成为重要的公共卫生问题。艰难梭菌对多种抗生素耐药，一线药物万古霉素和甲硝唑疗效下降，开发新型抗菌药物对控制艰难梭菌感染具有重要意义。

替拉扎明（LMP-027）是正在进行临床试验的抗肿瘤药物，对乏氧细胞有选择性毒性。我们研究发现，替拉扎明对多种需氧、兼性厌氧和厌氧菌均有抗菌作用，尤其对艰难梭菌有良好的抗菌活性，其最小抑菌浓度极低，只有 15 ng/mL，30 分钟内即达到最大杀菌作用。由于替拉扎明是抗肿瘤药物，毒副作用远比抗生素要高，因此，我们对低毒的替拉扎明衍生物 20q 的抗艰难梭菌活性也进行了研究，结果发现 20q 对艰难梭菌最小抑菌浓度比替拉扎明高约 65 倍，抗菌活性不如替拉扎明。为了取得更好的抗菌作用效果，我们对替拉扎明与金诺芬、脱氢抗坏血酸的联合使用抗菌效果进行研究。研究发现，替拉扎明与金诺芬以及脱氢抗坏血酸均有加成抑菌和协同杀菌作用，金诺芬和脱氢抗坏血酸对艰难梭菌也有相似的抗菌作用。替拉扎明对哺乳类动物细胞作用机制是 DNA 损伤，但对细菌的作用机制还不完全清楚。我们富集筛选出替拉扎明耐受突变体，发现其在一个辅酶 A 结合蛋白和一个可能抑制半胱氨酸合成的 Rrf2 家族转录调控因子基因上发生了突变，因此推测细菌替拉扎明耐受机制与辅酶 A 相关的下游反应或半胱氨酸合成有关。综上所述，替拉扎明对艰难梭菌有良好的抗菌活性，对其加以改造降低其毒性或者通过联合用药提高其抗菌活性，会有广阔的临床应用前景。

关键词：替拉扎明 艰难梭菌 老药新用

Abstract

Antimicrobials are powerful weapons against bacterial infection. Since the first antibiotic, penicillin, was discovered and applied to clinic, people have developed many kinds of antimicrobial agent. However, drug-resistance is becoming increasingly serious due to misuse and overuse of antimicrobials. The emergence of multi-drug resistant bacteria is a severe threat to human health. This emergency necessitates the urgent development of novel antimicrobials to cure infection caused by multi-drug resistant bacteria. Development of novel antimicrobials in traditional way is costly, risky, and time-consuming so that pharmaceutical industrials are reluctant to invest in antimicrobial research and development. Repurposing of an existing drug for antimicrobial use is a new method to develop novel antimicrobials. Since these drugs are either already approved or are in late stage clinical trials, abundant safety profiles, pharmacokinetics, and dosing/formulation issues have been established, which greatly reduces the costs and risks of antimicrobial development. The morbidity and mortality of *Clostridium difficile* infection (CDI) have increased dramatically due to overuse of broad-spectrum antimicrobials. Since CDI has shown resistance to traditional therapeutic agent, vancomycin and metronidazole, development of novel antimicrobials against *Clostridium difficile* that is resistant to multiple antibiotics is urgently needed to control CDI.

LMP-027(Tirapazamine,TPZ) is an anticancer drug that is in clinical trial. It is characterized as being highly selective toward hypoxic cells. We found that TPZ has antibacterial activity against aerobic, facultative anaerobic and anaerobic bacteria, especially against *Clostridium difficile*. The minimum inhibitory concentration of TPZ against *Clostridium difficile* was 15 ng/mL and TPZ is rapidly bactericidal, with maximal lethality achieved 30 minutes after drug administration. Since TPZ has been developed as an anti-cancer drug that has a much less stringent requirement on adverse effect, we also tested the antibacterial activity of a TPZ derivative, 20q, reported having an improved toxicity profile. The MIC of 20q against *Clostridium difficile* is nearly 65-fold higher than TPZ, therefore 20q presented poorly antibacterial activity compared to TPZ. In order to enhance antibacterial effect of TPZ, we tried drug combination therapy

and found that TPZ in combination with auranofin or dehydroascorbic acid, was at least additive in bacterial growth inhibition and was synergistic in bacterial killing. Auranofin and dehydroascorbic acid showed similar antibacterial effect against *Clostridium difficile*. The mechanism of TPZ for mammalian cells is thought to derive from DNA damage. How TPZ kills bacteria is not well understood. Since TPZ -resistant mutant are difficult to select, we enriched and screened TPZ tolerant mutants and found point mutations in genes encoding a CoA binding domain protein and an Rrf2 family transcription regulator that probably represses cysteine synthesis, indicating that the tolerant pathway may involve CoA metabolism and thiol pool. In conclusion, TPZ has excellent activity against *Clostridium difficile* and is a promising candidate for treatment of CDI.

Key Words: Tirapazamine; *Clostridium difficile*; Drug-repurposing

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章 绪论	1
1.1 艰难梭菌概述	1
1.1.1 艰难梭菌流行病学.....	1
1.1.2 艰难梭菌毒素.....	3
1.1.3 肠道菌群与艰难梭菌感染的关系.....	4
1.1.4 艰难梭菌感染药物治疗.....	5
1.1.5 艰难梭菌感染粪便秘植疗法.....	7
1.2 替拉扎明	8
1.3 金诺芬	10
1.4 脱氢抗坏血酸	12
1.5 本研究的内容与意义	13
第二章 材料与方法	14
2.1 实验材料	14
2.1.1 菌株.....	14
2.1.2 实验仪器.....	14
2.1.3 实验试剂.....	15
2.2 实验方法	17
第三章 实验结果	24
3.1 替拉扎明对厌氧、兼性厌氧和需氧菌的抑菌作用	24
3.2 替拉扎明对艰难梭菌的快速杀菌作用	25
3.3 替拉扎明衍生物 20q 抗艰难梭菌作用	26
3.4 替拉扎明与脱氢抗坏血酸的联合抗菌作用	28
3.5 替拉扎明与金诺芬的联合抗菌作用	30
3.6 金诺芬与脱氢抗坏血酸的联合抗菌作用	31
3.7 替拉扎明耐受突变体富集	33
3.8 野生型和替拉扎明耐受突变型艰难梭菌的生长曲线	34

3.9 替拉扎明耐受突变株表型验证	34
3.10 细菌基因组 DNA 提取	36
3.11 全基因组重测序结果分析	37
第四章 讨论	40
第五章 总结和展望	43
附录	44
参考文献	45
文献综述	54
在学期间发表的论文	64
致谢	65

厦门大学博硕士论文摘要

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Overview of <i>Clostridium difficile</i>	1
1.1.1 Epidemiology of <i>Clostridium difficile</i>	1
1.1.2 Toxin of <i>Clostridium difficile</i>	3
1.1.3 Relationship between of gut flora and <i>Clostridium difficile</i> infection.....	4
1.1.4 Antimicrobial treatment of <i>Clostridium difficile</i> infection	5
1.1.5 Fecal microbiota transplantation treating <i>Clostridium difficile</i> infection	7
1.2 Tirapazamine	8
1.3 Auranofin	10
1.4 Dehydroascorbic acid	12
1.5 Content and significance of this study	13
Chapter 2 Materials and methods	14
2.1 Materials	14
2.1.1 Strains	14
2.1.2 Devices.....	14
2.1.3 Reagents.....	15
2.2 Methods	17
Chapter 3 Results	24
3.1 Bacteriostatic effect of tirapazamine against aerobic, facultative anaerobic and anaerobic bacteria	24
3.2 Bactericidal effect of tirapazamine against <i>Clostridium difficile</i>	25
3.3 Antibacterial activity of tirapazamine derivative 20q against <i>Clostridium difficile</i>	26
3.4 Combined antibacterial activity of tirapzamine and dehydroascorbic acid	28
3.5 Combined antibacterial activity of tirapzamine and auranofin	30
3.6 Combined antibacterial activity of auranofin and dehydroascorbic acid ..	31
3.7 Enrichment of tirapazamine tolerant mutants	33
3.8 Growth curves of WT and tirapazamine tolerant mutant of <i>Clostridium difficile</i>	34

3.9 Phenotypic validation of tirapazamine tolerant mutant	34
3.10 Extraction of bacterial genome DNA	36
3.11 Results analysis of whole genome resequencing	37
Chapter 4 Discussion	40
Chapter 5 Conclusion and prospectives	43
Appendix	44
References	45
Review	54
Publications	64
Acknowledgement	65

厦门大学博硕士学位论文摘要

缩略词表

英文缩写	英文全名	中文全名
LMP-027	Tirapazamine	替拉扎明
DHA	Dehydroascorbic acid	脱氢抗坏血酸
MIC	Minimum inhibitory concentration	最小抑菌浓度
rpm	Revolutions per minute	转数每分钟
ROS	Reactive oxygen species	活性氧簇
FIC	Fractional inhibitory concentration	部分抑菌浓度指数
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
CDI	Clostridium difficile infection	艰难梭菌感染
VAN	Vancomycin	万古霉素
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷

第一章 绪论

1.1 艰难梭菌概述

1.1.1 艰难梭菌流行病学

艰难梭菌是专性厌氧革兰氏阳性芽孢杆菌,可以产生毒素,由 Hall 和 O'Tolle 在 1935 年首次发现,其对营养要求较高,分离培养困难。艰难梭菌被发现后没有受到太大的关注,直到 1978 年首次报道艰难梭菌是造成假膜性肠炎和抗生素相关感染的原因之一,才逐渐受到关注^[1]。长期服用抗生素和住院的病人是艰难梭菌感染 (*Clostridium difficile* infection, CDI) 的高危人群,近年来由于高产毒和多耐药株 027/BI/NAP1 的出现和流行,艰难梭菌感染死亡率不断上升,对人类健康构成严重威胁,造成沉重的医疗负担和经济损失^[2]。

近几十年来,艰难梭菌感染的发病率和死亡率不断增加,特别是在欧洲和北美洲等发达国家和地区,CDI 已成为肠胃炎相关疾病死亡的重要原因^[3]。在美国,2001 年住院成年病人 CDI 发病率是 4.5 每千人,在 2010 年该发病率为 8.2 每千人,上升了近一倍,而死亡率也有轻微上升,从 2001 年的 6.6% 上升到 2010 年的 7.2%^[4]。在一项东欧住院病人 CDI 研究中,2010 年~2013 年 5 月,CDI 发病率是 21 每千人,严重 CDI 的发病率是 2.63 每千人,出院后 12 周 CDI 复发率是 11.3%^[5]。除了一般散发性流行,CDI 也会呈爆发性流行,如 1998~2001 年间加拿大魁北克省住院病人 CDI 发病率是 5.8 每千人,2002~2005 年爆发流行时为 15.5 每千人,发病率大幅上升,而 2005 年中到 2006 年发病率又恢复到 1998~2001 的水平^[6]。随后的调查发现,造成这次 CDI 爆发性流行的菌株是 027 菌株分型是 NAP1/027^[7]。过去认为 CDI 主要发生在住院病人中,近年来研究发现,社区相关性 CDI 发病率不断上升。一项基于地区统计结果估算全国发病率的调查发现,2011 年美国社区相关性 CDI 发病率约为 51.9 每十万人,高于之前报道的 7.6 每十万人^[8]。CDI 发病率不断上升,造成的医疗负担日益严重,有研究发现,德国 CDI 病人住院时间与配对的对照组相比,延长了 7 天;英国同类研究发现,英国 CDI 病人住院时间延长了 14 天^[9, 10]。Napolitano 等研究发现,德国汉诺威医院

CDI 病人每人平均医疗费用是 33840 欧元，而配对的对照组是 7147 欧元，CDI 发生后医疗费用明显提高^[9]。在美国，2014 年因 CDI 而造成的额外医疗开支达 54 亿美元^[11]。因此，CDI 使医疗开支大幅上升，造成沉重的医疗负担。

过去已经有研究对艰难梭菌感染的危险因素进行研究，抗生素的长期使用是主要的危险因素，尤其是克林霉素、头孢菌素和氟喹诺酮类抗生素的长期使用是 CDI 发生高风险因素^[12]。长期使用抗生素会使人体肠道菌群发生改变，有助于艰难梭菌增殖和产生毒素，导致 CDI 的发生。抑酸剂的使用是另一个 CDI 危险因素，其导致 CDI 发生的机制还不明确，可能是由于胃部酸性减少，通过消化道传播的艰难梭菌芽孢更容易存活，从而导致 CDI 的发生^[13]。长时间住院也是 CDI 的危险因素，CDI 在医院的发病率高于社区，长时间暴露在艰难梭菌相对较多的环境容易导致 CDI 的发生^[12]。其他的 CDI 的危险因素包括：病人的年龄、与 CDI 患者长时间接触、患有其他基础性疾病（如慢性肺疾病、糖尿病和癌症等）、使用免疫抑制药物等^[14]。

不同的艰难梭菌菌株毒力和危害并不一样，高毒株的出现使近年 CDI 发病率和死亡率显著上升。核糖体型 027 高毒菌株能产生毒素 A、毒素 B 和二元毒素，其造成 CDI 死亡率比低毒株如核糖体型 001 和 014 高 3 倍^[15]。因此，艰难梭菌菌株的分型对指导临床治疗和预后评估十分重要。目前，大多数艰难梭菌分子流行病学数据来自欧洲和北美地区等发达国家，缺乏亚非等发展中国家数据。而且不同地区的菌株分型方法并不相同，欧洲用核糖体型对艰难梭菌进行分型，而北美用脉冲场凝胶电泳进行分型，缺乏全球统一的标准，这给不同地区流行菌株的比较带来不便^[16]。2008 年，一次 34 个欧洲国家参与的调查发现，在这些国家中，最常见的菌株依次是核糖体型 014/020、001 和 078^[17]。2011 至 2013 年间在美国 32 家医院进行的调查发现，最常见的菌株依次为核糖体型 027、014/020 和 106^[18]。一项系统性回顾研究发现，中国大陆主要流行的艰难梭菌菌株依次是核糖体型 006、017 和 012，欧美流行的高毒株核糖体型 027 和 078 发病率很低^[19]。不同国家和地区艰难梭菌流行的菌株不相同，且发达国家和发展中国家差异较大。因此，必须根据本国的实际菌株流行情况制定艰难梭菌感染防控措施和政策。另外，艰难梭菌对多种抗生素耐药，而且耐药情况日趋严重，一项在美国进

行的多中心研究发现,艰难梭菌对克林霉素和莫西沙星的耐药率分别为 36.8%和 35.8%^[18]。在中国进行的同类研究发现,中国的艰难梭菌耐药情况更为严重,其对克林霉素、红霉素、四环素和莫西沙星耐药率分别为 79.6%, 75.3%, 46.9%, 45.1%^[20]。为了应对越来越严峻的艰难梭菌耐药情况,我们需要开发新的抗艰难梭菌药物应对艰难梭菌感染。

1.1.2 艰难梭菌毒素

艰难梭菌产生毒素是其造成腹泻的原因,不产生毒素的菌株不引起腹泻。艰难梭菌毒素主要有三种,分别是毒素 A(TcdA)、毒素 B(TcdB)和二元毒素(CDT)。毒素 A 是肠毒素,分子量为 308 kDa,由 *tcd A* 基因编码,毒素 B 是细胞毒素,分子量为 269 kDa,由 *tcd B* 基因编码。毒素 A 和毒素 B 属于大型梭菌毒素(LCT)家族,结构相似,均为四聚体结构,分别为葡糖基转移酶结构域、半胱氨酸蛋白酶结构域,其余两个结构域构成的疏水蛋白序列组成^[21]。毒素 A 和毒素 B 在低 pH 的情况下在宿主细胞膜形成孔道,毒素 A 形孔作用需要胆固醇的参与;毒素 B 的疏水区域有形孔活性。在宿主细胞膜形成孔道后,毒素 B 和肌醇六磷酸结合,半胱氨酸蛋白酶域构象改变,导致葡糖基转移酶域和半胱氨酸蛋白酶域之间位点发生自催化剪切,从而使氨基端的糖基转移酶域进入细胞质^[21]。

GTP 酶对维持细胞正常生理功能十分重要,如形成肌动蛋白细胞骨架、调控上皮屏障、参与免疫细胞的信号传导和移动等^[22]。毒素 A 和毒素 B 上的 Rho 和 Rac 葡糖基转移酶域使靶细胞中 GTP 酶糖基化,从而失去活性。因此,细胞骨架受到破坏,导致肠上皮细胞紧密连接和肠上皮完整性受损。细胞结构受到破坏后,细胞变圆,凋亡^[23]。另外两个结构域组成一段疏水蛋白序列,其可以嵌入宿主细胞膜并与宿主细胞膜上的受体结合。过去研究认为,毒素 A 是艰难梭菌的主要毒力因子,然而,现在研究认为毒素 B 也起到重要毒力作用。另外,有研究发现,毒素 B 的体内靶标是半胱氨酸蛋白酶结构域(cysteine protease domain, CPD),用 CPD 抑制剂依布硒啉(ebselen)治疗艰难梭菌感染小鼠,发现小鼠肠上皮受损减少,这也证明毒素 B 在艰难梭菌感染起重要作用,艰难梭菌毒素拮抗剂可用于 CDI 治疗^[24]。

除了这两种毒素,一些高毒菌株可以产生另外一种毒素,由于该毒素由 CDTa 和 CDTb 两部分组成,所以被称为二元毒素。二元毒素分别由 *cdt A* 和 *cdt B* 基因编码,与毒素 A 和毒素 B 不同的是,二元毒编码基因不在致病决定区(paLoc)上。二元毒素是一种 ADP-核糖转移酶。CDTa 是二元毒素 ADP-核糖转移酶的活性中心,使宿主细胞内的肌动蛋白核糖基化,CDTb 与宿主细胞结合并把 CDTa 转运到细胞质中的二元毒素细胞受体脂解激活脂蛋白受体(LSR)^[25]。核糖基化作用引起肌动蛋白细胞骨架解聚,另外,形成的微管膜突起交织在上皮细胞上,有助于细菌黏附^[26]。

1.1.3 肠道菌群与艰难梭菌感染的关系

处于正常情况下的肠道菌群可以预防 CDI 发生,CDI 一般发生在住院病人而且长时间服用抗生素,抗生素对肠道细菌的数量和组成均有显著的影响,抗生素对肠道菌群破坏是诱发 CDI 的重要因素^[27]。艰难梭菌动物感染模型和肠道微生物生态研究表明,艰难梭菌、肠道菌群和宿主其他因素构成一个复杂系统,其中一部分发生异常会提高发生 CDI 风险^[28]。近年来,越来越多研究关注艰难梭菌、宿主组织和肠道菌群之间的关系,因此,艰难梭菌动物感染模型对这些研究十分重要,金黄地鼠是第一种运用到艰难梭菌感染模型动物,后来,小鼠也成功运用到艰难梭菌感染模型^[29]。金黄地鼠对艰难梭菌较为敏感,感染发病进程较快,现常用于艰难梭菌急性期研究,小鼠对艰难梭菌敏感程度低于金黄地鼠,现多用于艰难梭菌亚慢性、慢性期研究。艰难梭菌动物感染模型肠道菌群研究发现,在预后较好的个体肠道菌群中,壁厚菌门所占的比例较高,这与没有艰难梭菌感染个体中肠道群中所占比例相似。相反,在感染症状严重个体中,壁厚菌门减少,变形菌门增多,壁厚菌门可以抑制艰难梭菌增殖^[30]。另一方面,大肠埃希氏菌对艰难梭菌增殖没有抑制作用,而毛螺菌显著抑制艰难梭菌增殖,减缓 CDI 的发展^[28]。

CDI 病人肠道菌群研究结果与动物实验结果相似,与健康个体相比,CDI 病人肠道菌群组成并不相同^[31]。CDI 病人肠道菌群中,乳杆菌科、肠杆菌科细菌丰度上升,拟杆菌属、拟杆菌属和普氏菌属细菌丰度下降^[31]。CDI 病人粪便样品几

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库